

## Säilytettävän aineiston tautipuhdistus kryoterapialla

Qiaochun Wang<sup>1,3</sup>, Jaana Laamanen<sup>2</sup>, Anna Nukari<sup>2</sup>, Marjatta Uosukainen<sup>2</sup>, Jenni Kesulahti<sup>1</sup>  
ja Jari Valkonen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Kasvipatologian laboratorio, Soveltavan biologian laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto*

<sup>2</sup>*MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Antinniementie 1, 41330 Vihtavuori*

<sup>3</sup>*College of Horticulture, North West Agricultural University, Yangling, Xhaanxi, P.R. China*

### Tiivistelmä

Suvuttomasti lisättävät viljelykasvit ja monivuotiset koristekasvit ovat erityisen uhanalaisia virus-tartunnoille, sillä lisäystapa ja monivuotisuus ovat omiaan lisäämään tartunnan riskiä. Perunan, ryväs- ja valkosipulin, vadelman ja monien muiden kasvien tuottavuus taantuu virusten takia, ellei viljelmiä uusita aika ajoin terveellä aineistolla. Koristekasvit puolestaan menettävät näyttävyytensä virusten aiheuttamien oireiden ja kitukasvuisuuden takia ja sietävät sairaina huomommin muitakin stressejä.

Kylmäsäilytys nestetyössä tunnetaan geenivarojen ylläpitomenetelmänä, mutta se sopii myös kasvupisteiden puhdistamiseen viruksista, jolloin sitä kutsutaan kryoterapiaksi. Tämän työn tavoitteena oli käyttää kryoterapiaa tervetaimien tuottamiseen viroottisesta vadelman jalostulinjasta, joka on ominaisuuksiltaan lupaava mutta jota ei ole kuitenkaan pystytty puhdistamaan vadelman kääpiökasvuviruksesta (RBDV). Tämä on estänyt jalosteen tuonnin markkinoille. Aluksi kryomenetelmä optimoitiin useille vadelmalajikkeille, jotta mahdollisimman suuri osuus kasvupisteistä selviytyisi käsittelystä. Näillä olosuhteilla ei kuitenkaan saatu yhtään virusvapaata kasvia. Seuraavaksi kokeiltiin termoterapiaa, joka on jo kauan tunnettu terveiden kasvien saantoa lisäävänä menetelmänä. Sekään ei yksistään tuottanut terveitä taimia. Lopulta kokeiltiin kasvupisteiden käsittelyä kryoterapialla termoterapian jälkeen. Kryokäsittelyn jälkeen kasvuun lähteneistä kasvupisteistä kolmannes tuotti terveen taimen, kun termoterapia kesti 28-36 vrk.

Kokeissa saatiin ensi kertaa viitteitä siitä, mihin termoterapian vaikutus viruspuhdistuksessa perustuu. Sen havaittiin kiihdyttävän virus-RNA:n hajotusta kasvupisteissä. Kryoterapia puolestaan tuhosi lämpökäsittelystä kasvupisteistä kaikki muut paitsi vähiten erilaistuneet solut. Siten nämä menetelmät yhdistettyinä tuhosivat suurimman osan viroottisista soluista. Jäljelle jääneissäkin viroottisissa soluissa virus-RNA oli todennäköisesti suurelta osin hajonnut.

Puhdistettua materiaalia voidaan nyt käyttää jatkokokeisiin ja uuden lajikkeen kaupallistamiseen. Materiaalia voidaan siirtää kryoterapiasta myös suoraan pitkäaikaissäilytykseen. Suomalaisesta tervetaimituotannosta on tullut edelläkävijä kryoterapian käytössä puhtaan lisäys-aineiston tuottamiseksi.

Asiasanat: kasvinsuojelu, virus, kylmäsäilytys, marjanviljely, vadelma, kryoterapia, termoterapia

## Johdanto

Suvuttomasti lisäävät, monivuotiset puutarhakasvit kuten vadelma ovat erityisen uhanalaisia virustartunnoille. Lisäystapa ja monivuotisuus ovat omiaan lisäämään tartunnan riskiä ja viruksien yleistymistä viljelmällä. Viljelmät on uusittava aika ajoin terveellä aineistolla. Tervettä materiaalia tulisi olla tarjolla, mutta kasvien puhdistaminen viruksista ja ylläpito solukkoviljelyssä on aikaa vievää, kallista eikä aina ongelmaton. Jatkuva kasvatusta ja monistaminen solukkoviljelyssä voivat aiheuttaa perinnöllisiä muutoksia, mitä joudutaan tarkkailemaan. Tehokkaampia menetelmiä tarvitaan niin kasvien puhdistamiseen taudinaiheuttajista kuin terveen kasvimateriaalin pitkäaikaissäilytykseenkin.

Elävien kasvupisteiden ja alkioiden kylmäsäilytys nestetyössä (-196°C) tunnetaan geenivarojen ylläpitomenetelmänä, mutta se sopii myös kasvupisteiden puhdistamiseen viruksista, jolloin sitä kutsutaan kryoterapiaksi. Kryoterapia vaikuttaa perinteistä meristeemiviljelyä tehokkaammalta menetelmältä terveen lisäysaineiston tuottamiseen viroottisista kasveista (Brison ym. 1997; Helliott ym. 2002; Wang ym. 2003, 2006). Puhdistunut materiaali voidaan lisäksi siirtää suoraan pitkäaikaissäilytykseen.

MTT Kasvintuotannon tutkimus Laukaassa ylläpitää ominaisuuksiltaan varsin lupaavaa vadelman jalostuslinjaa, jota ei ole kuitenkaan saatu puhdistettua vadelman kääpiökasvuviruksesta (RBDV). Jalostuslinjan tuonti markkinoille on sen vuoksi estynyt. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tuottaa virusvapaata aineistoa tästä jalostuslinjasta kryoterapian avulla. Samalla päätettiin tutkia mahdollisuutta tehostaa viruspuhdistusta entisestään yhdistämällä kryoterapia jo aiemmin tunnetun lämpökäsittelyn eli termoterapian kanssa.

## Aineisto ja menetelmät

### *Kasvimateriaali*

Vadelman kääpiökasvuviruksen tartuttamaa vadelmakloonaa Z13 (Wang ym. 2005) monistettiin ja kasvatettiin solukkoviljelyssä kasvatusalustalla (pH 5.0), joka koostui MS-suoloista (Murashige & Skoog 1962) ja johon oli lisätty myoinositolia (100 mg), sakkaroosia (30 g) ja kasvuhormoneja (BAP, 0.5 mg; IBA, 0.05 mg). Lopuksi kasvatusalusta hyydytettiin Bacto-agarilla (3.5 g) (Difco Laboratories, Madison, USA) ja Gelrite'llä (1.2 g) (Merck & Co. Inc., Rahway, NJ, USA) (määrät ilmoitettu litraa kohti). Alusta steriloidtiin autoklavoimalla (121°C, 16 min). Kasvatushuoneen lämpötila oli  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , valojakso 16 h ja valon voimakkuus  $45 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$  (loisteputkivalo).

### *Kryoterapia*

Versojen kärjistä eristettiin 0.1 mm (sis. nuorimman lehtiaiheen), 0.2 mm ja 0.3 mm (sis. kaksi nuorinta lehtiaihetta) kokoisia kasvu-pisteitä. Niitä viljeltiin ensin em. kasvatusalustalla, johon oli lisätty aktiivihiltä 2.5 g/l, ja sen jälkeen normaalilla perusalustalla. Kryoterapia tehtiin Wangin ym. (2005) kuvaamalla tavalla. Versonkärjet kapseloitiin sekoittamalla ne Na-alginaattiliuokseen (väkevyys 2.5 g/l), jossa oli MS-suoloja 4.4 g/l, glyserolia (2 M) ja sakkaroosia (0.4 M). Tässä liuoksessa kasvupisteet pudotettiin pipetillä yksi kerrallaan 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  -liuokseen, jossa alginaatti muodosti helmimäisiä, kiinteitä pisaroita. Jokainen niistä sisälsi yhden kasvupisteen. Tämän jälkeen kapseloidut versonkärjet siirrettiin steriilille suodatinpaperille, jonka päällä niiden annettiin kuivahtaa muutaman sekunnin ajan. Valmiit kapselit siirrettiin ensimmäiselle esikasvatus-alustalle, joka sisälsi 4.4 g/l MS, 0.25 M sakkaroosia ja 2.6 g/l Gelriittiä (pH 5.8). Vuorokauden kuluttua kapselit siirrettiin toiselle esikasvatusalustalle, joka sisälsi 4.4 g/l MS, 0.50 M sakkaroosia sekä 2.6 g/l Gelriittiä (pH 5.8). Jälleen vuorokauden kuluttua kapselit siirrettiin vuorokaudeksi kolmannelle ja viimeiselle esikasvatusalustalle, joka sisälsi 4.4 g/l MS, 0.75 M sakkaroosia ja 2.6 g/l Gelriittiä (pH 5.8).

Kapseloidut versonkärjet siirrettiin esikasvatuksen jälkeen latausliuokseen 90 minuutiksi huoneenlämpöön. Latausliuos sisälsi 4.4 g/l MS, 2 M glyserolia ja 0.8 M sakkaroosia pH:n ollessa 5.8. Latausliuoksesta kapselit siirrettiin steriilille suodatinpaperille, jonka päällä niiden annettiin kuivahtaa muutaman sekunnin ajan. Seuraavaksi kapselit siirrettiin vitrifikaatioliuokseen (PVS2) 3 tunniksi huoneenlämpöön ja siitä 1.0 ml:n kryoputkiin (Nalgene Cryoware, Nalge Nunc International, NY), jotka upotettiin nestetyppeen puoleksi tunniksi. Nestetypestä putket siirrettiin vesihäuteeseen (+40°C) 3 minuutiksi. Tämän jälkeen versonkärjet siirrettiin kryoputkista purkuliuokseen 20 minuutiksi huoneenlämpöön. Purkuliuos sisälsi 4.4 g/l MS ja 1 M sakkaroosia (pH 5.8). Kaikki kapselit siirrettiin pintakuivauksen jälkeen ammoniumvapaille MS-maljoille, käärrittiin folioon ja vietiin kasvatushuoneeseen. Neljän vuorokauden kuluttua folio poistettiin.

Kryokäsittelystä elävinä selviytyneet kasvupisteet tunnistettiin vihreästä väristään 2 viikon viljelyn jälkeen. Kasvuunlähtökykyisten (regeneroituvien) kasvupisteiden osuus määritettiin 6 viikon kasvatuksen kuluttua. Yli 3 mm mittaiset versot siirrettiin ylläpitoalustalle, jossa niitä viljeltiin edellä kuvattuun tapaan.

### ***Termoterapia***

Solukkoviljelytaimia kasvatettiin lämpöhuoneessa 16 tunnin valojaksossa 21-42 vrk. Lämpötila oli päivällä 38°C ja yöllä 26°C. Versoista eristettiin lämpökäsittelyn jälkeen kasvupisteet viljeltäväksi yllä mainitulla perusalustalla, tai kasvupisteille tehtiin kryokäsittely.

### ***Virustestaus***

Taimista testattiin RBDV DAS-ELISA-menetelmällä tai käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktiolla (RT-PCR). Testaukseen käytettiin myös lineaariseen DNA-monistukseen kehitettyä LAMP-menetelmää (Fukuta ym. 2003), joka on nopea eikä vaadi erityisiä laitteita, toisin kuin RT-PCR. LAMP-menetelmässä viruksen cDNA:ksi kopioitua genomiosaa monistetaan vakio- $65^{\circ}\text{C}$  lämpötilassa (65°C) tunnin ajan. Monistuminen eli näytteen viroottisuus todetaan reaktioliuoksen samentumisen perusteella (Mori ym. 2001). Muuta reaktioliuoksen analysointia tai mittaamista ei tarvita tuloksen toteamiseksi.

### **Tulokset ja tulosten tarkastelu**

Aluksi kryomenetelmä optimoitiin useille vadelmalajikkeille, jotta mahdollisimman suuri osuus kasvupisteistä selviytyisi käsittelystä (Wang ym. 2005). Näillä olosuhteilla ei kuitenkaan saatu yhtään RBDV:sta vapaata kasvia (Taulukko 1).

Seuraavaksi otettiin avuksi termoterapia, joka on kauan tunnettu menetelmä viruspuhdistuksen tehostamiseksi (Kassanis 1950). Solukkoviljelytaimia pidettiin päivittäisen valojakson ajan 38°C:ssa ennen kuin niistä eristettiin kasvupisteet. Kuitenkaan termoterapiakaan ei tuottanut terveitä taimia, vaikka vasta-aineiden avulla havaittu viruspitoisuus väheni solukoissa huomattavasti lämpökäsittelyn aikana. Myös suurin osa virus-RNA:sta hajosi, mikä osoitettiin analysoimalla eristettyä RNA:ta kalvohybridisaatiomenetelmällä (Wang ym. 2007). RBDV paikannettiin lämpökäsittelyssä kärkikasvupisteissä tekemällä niistä ohutleikkeitä ja värjäämällä virusta sisältävät solut virusvasta-aineella (Wang ym. 2007). Virusta oli yhä etenkin ensimmäisessä lehtiaiheessa. Koska pieninkin kärkikasvupiste (0.1 mm), joka pystyttiin eristämään, sisälsi ensimmäisen lehtiaiheen (Kuva 1), nämä tulokset selittivät, miksi termoterapialla ei kyetty puhdistamaan kasveja RBDV:sta.

Kasvupisteiden käsittely kryoterapialla termoterapian jälkeen tuotti virusvapaita taimia. Eristetyistä kasvupisteistä keskimäärin 5 %, tai, toisin ilmoitettuna, käsittelyjen jälkeen kasvuun lähteneistä kasvupisteistä 33-35 % tuotti terveen taimen (Taulukko 1). Tähän saantoon tarvittiin 28-36 vrk:n mittainen termoterapia. Jos termoterapiaa jatkettiin kauemmin, kasvupisteiden elävyys heikkeni liiaksi. Kärkikasvupisteiden solujen hienorakennetta tarkasteltiin elektronimikroskoopilla ennen kryokäsittelyä. Lämpökäsittelyn todettiin johtaneen vakuolien määrän kasvuun sekä niiden suurentumiseen suhteessa solun kokonaistilavuuteen (Wang ym. 2007). Lisäksi solujen koko kasvoi. Nämä muutokset olivat havaittavissa erilaistuneemmissa soluissa, kun taas kärkikasvupisteiden nuorimmissa soluissa muutokset olivat hyvin vähäisiä. Kryokäsittelyn jälkeen tehdyissä histologisissa värjäyksissä

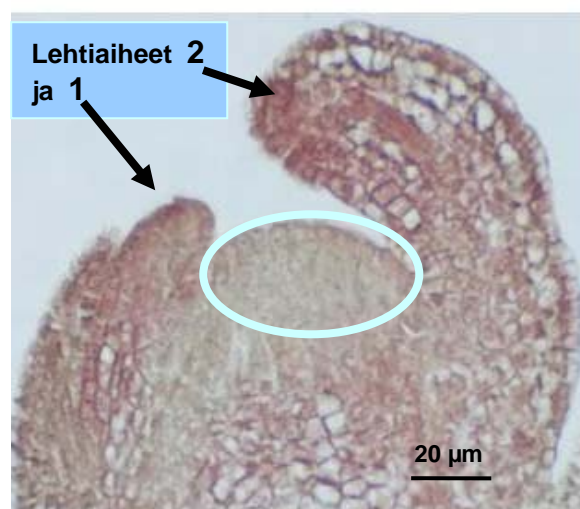
havaittiin niiden solujen tuhoutuneen, jotka kokivat havaittavia muutoksia lämpökäsittelyn aikana. Koska nämä solut olivat myös niitä, joissa virusta oli havaittavia määriä, pääteltiin termo- ja kryoterapian yhteensä pystyneen tuhoamaan solukot, jotka sisälsivät virusta. Kuitenkaan aivan kaikki solut eivät kuolleet näissä erilaistuneemmissakaan solukoissa, kuten ensimmäisessä lehtiaiheessa. Se selittänee, miksi lopulta vain noin kolmannes saaduista taimista oli virusvapaita (Taulukko 1).

Taulukko 1. Solukkoviljelytaimien lämpökäsittelyn (termoterapian) keston vaikutus vadelman kärkikasvupisteiden selviytymiseen kryoterapiasta sekä niiden puhdistumiseen vadelman kääpiökasvuviruksesta (RBDV).\*

Versojen termoterapian kesto (vrk)	Elävien kärkikasvupisteiden osuus kryoterapian jälkeen (%)	Kasvuun lähteneiden kärkikasvupisteiden osuus eloonjääneistä (%)	RBDV-vapaiden taimien osuus kasvuun lähteneistä (%)†
0	85a	78a	0
21	48b	60b	0
28	36c	40c	33
35	20d	30d	35
42	0	0	0

\* Taulukossa esitetään kahden kokeen keskiarvot. Kokeiden välillä ei ollut merkitsevää eroa. Molemmissa kokeissa kunkin eripituisen termoterapiajakson jälkeen eristettiin kolme 60 kärkikasvupisteen erää. Eloonjääminen arvioitiin 2 viikon kuluttua kryoterapiasta. Kasvuunlähtö arvioitiin 6 viikkoa kryoterapian jälkeen. Sarakkeen keskiarvot, jotka on merkitty eri kirjaimin, eroavat toisistaan merkitsevästi ( $p < 0.05$ , Student's *t*-test).

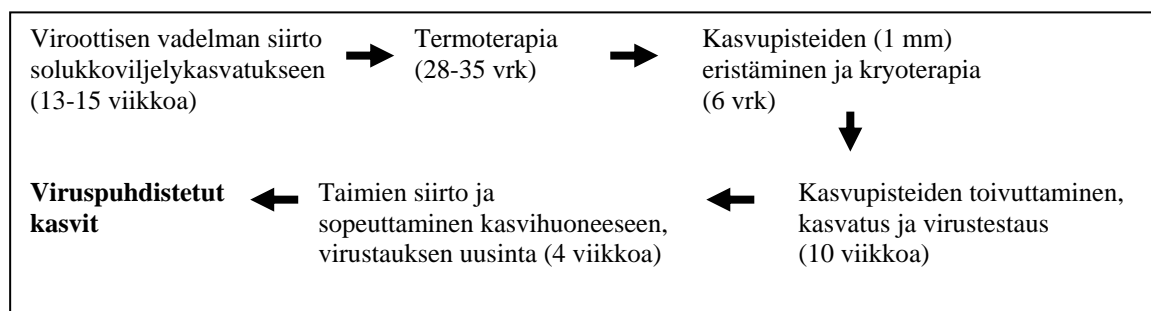
† Virus testattiin 2 kk ikäisistä solukkoviljelytaimista DAS-ELISA- ja/tai RT-LAMP-menetelmällä.



Kuva 1. Vadelman kärkikasvupiste. Nuorin lehtiaihe (1) ja toiseksi nuorin lehtiaihe (2) sisältävät vadelman kääpiökasvuvirusta, samoin kuin muut kärkikasvupisteen erilaistuneemmat solukot. Kaikista nuorin, jakautuva ja virusvapaa solukko on rengastettu.

## Johtopäätökset

Termo- ja kryoterapian yhdistäminen osoittautui tässä työssä tehokkaaksi keinoksi puhdistaa vadelma kääpiökasvuviruksesta (RBDV). Menetelmän vaiheet ja niihin kuluva aika on esitetty kaavamaisesti kuvassa 2. Erilaistuneiden, virusta sisältävien solukoiden stressaaminen lämpökäsittelyllä heikensi niiden kykyä sietää syväjäädystä, jolloin termoterapian jälkeen annettu kryoterapia tuhosi viroottiset solukot lähes kokonaan. Niinpä kolmannes kasvuun lähteneistä kasvupisteistä tuotti terveen taimen. Tulos oli toistettavissa. Tämä on merkittävä parannus aiemmin käytettyihin menetelmiin, joilla RBDV:n tartuttamista vadelmista on saatu muutamia terveitä taimia vain satunnaisesti (Theiler-Hedtrich & Baumann 1989; Lankes 1995; Karesova ym. 2002), mutta useimmiten ei lainkaan.



Kuva 2. Kaavio työvaiheista sekä niihin kuluva ajasta viruspuhdistettujen vadelmien tuottamiseksi termo- ja kryoterapian avulla. Kryoterapia ei lisää merkittävästi viruspuhdistukseen kuluva kokonaisaikaa mutta tehostaa viruspuhdistusta huomattavasti.

Kasvien viruspuhdistus kasvupistelisäyksen avulla otettiin käyttöön Suomessa 1970-luvulla (Tapio 1972; Bremer & Ylimäki 1978). Useimpien virusten ja kasvien osalta perinteiset menetelmät ovat kohtuullisen tehokkaita. Sen sijaan siitepölylevintäisillä viruksilla, joihin RBDV kuuluu (Murant ym. 1974), on erityisen hyvä kyky tartuttaa kasvupisteen solukot jo varhaisessa kehitysvaiheessa. Niin pienen kasvupistekärjen leikkaaminen vadelmasta käsivaraisesti ei ole mahdollista, ettei siihen jäisi RBDV:n tartuttamaa solukkoa. Tässä työssä käytetyt käsittelyt sen sijaan hävittivät viroottiset solukot kärkikasvupisteestä eristämisen jälkeen. Siten ei ole tarrettakaan eristää kovin pieniä kasvupisteen kärkiä, mikä helpottaa työtä. Lisäksi, kryoterapia ei merkittävästi pidennä viruspuhdistukseen tarvittavaa aikaa, mutta tehostaa viruspuhdistusta huomattavasti. Tässä työssä kuvatun uuden menetelmän voidaan odottaa tulevan käyttöön kasvien viruspuhdistuksessa laajemminkin.

### ***Kiitokset***

Kiitämme Wilmer Cuellaria, Minna-Liisa Rajamäkeä ja Yukimasa Hirataa avusta tiettyjen analyysien suorittamisessa sekä Maa- ja metsätalousministeriötä ja Helsingin yliopistoa tutkimuksen rahoittamisesta.

### **Kirjallisuus**

- Bremer, K. & Ylimäki, A.** 1978. A certificate system to produce and distribute virus tested propagation material from berry plants in Finland. *Ann. Agric. Fenn.* 17: 42-44.
- Brisson, M., Boucaud, M.-T., Pierronnet, A. & Dosba, F.** 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus. *Plant Sci.* 123: 189-196.
- Fukuta, S., Iida, T., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J., Kanbe, M. & Ishimoto, Y.** 2003. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch. Virol.* 148: 1713-1720.
- Helliot, B., Panis, B., Poumay, Y., Swennen, R., Lepoivre, P. & Frison, E.** 2002. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Rep.* 20: 1117-1122.
- Karesova, R., Janeckova, M. & Paprstein, F.** 2002. Elimination of *Raspberry bushy dwarf virus* from raspberry cv. 'Gatineau'. *Acta Hort.* 585: 359-362.
- Kassanis, B.** 1950. Heat inactivation of leaf-roll virus in potato tubers. *Ann. Appl. Biol.* 37: 339-341.
- Lankes, C.** 1995. Elimination of raspberry bushy dwarf virus. *Acta Hort.* 385: 70-75.
- Mori, Y.T., Nagamine, K., Tomita, N. & Notomi, T.** 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 289: 150-154.
- Murant, A.J., Chambers, J. & Jones, A.T.** 1974. Spread of raspberry bushy dwarf virus by pollination, its association with crumbly fruit, and problems of control. *Ann. Appl. Biol.* 77: 271-281.

- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cell cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Tapio, E.** 1972. Virus-free clones on the potato varieties Pito and Tammiston Aikainen. *Ann. Agric. Fenn.* 11: 115-118.
- Theiler-Hedtrich, R. & Baumann, G.** 1989. Elimination of apple mosaic virus and raspberry bushy dwarf virus from infected red raspberry (*Rubus idaeus* L.) by tissue culture. *J. Phytopath.* 127: 193-199.
- Wang, Q., Cuellar, W., Rajamäki, M.L., Hirata, Y. & Valkonen, J.P.T.** 2007. Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants. *Mol. Plant Pathol.*, painossa.
- Wang, Q.C., Laamanen, J., Uosukainen, M. & Valkonen, J.P.T.** 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep.* 24: 280-288.
- Wang, Q.C., Liu, Y., He, W., Xie, Y.H. & You, M.S.** 2006 Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *Potato leaf roll virus* (PLRV) and *Potato virus Y* (PVY). *Potato Res.* 49: 119-129.
- Wang, Q.C., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I. & Tanne, E.** 2003. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci.* 165: 321-327.